

有機リン殺虫剤レプトホスのニワトリにおける遅発性神経毒性に関する研究

著者	紺野 信弘
号	236
発行年	1982
URL	http://hdl.handle.net/10097/15874

論文内容要旨

1971年の夏、エジプトのナイル川三角洲で約1,300頭の水牛が斃死した。症状は後肢の運動失調ではじまり、重症例では麻痺が進行して死亡するという特異的な中毒であった。後日アレキサンドリア大学のAbou-Doniaらが有機リン殺虫剤レプトホスによる中毒であることを動物実験により証明した。レプトホスは極少数の有機リン化合物にだけ認められる遅発性神経毒性(Delayed Neurotoxicity)を有していたのである。

レプトホスは $O-(4-bromo-2,5-dichlorophenyl)O-methyl\ phenylphosphonothioate$ は、^は我国では1969年からホスベルの商品名で市販されたが、数多いその他の有機リン剤とは異なる毒性を持つとすれば安全性確保の見地からも毒性学的検討を加えることは重要である。

本研究は、レプトホスをニワトリに投与し、毒性発現の条件及び体内分布等について検討し、遅発性神経毒性試験法の確立ならびに本毒性の機序解明の手懸りを得ようとしたものである。

1. レプトホスの投与方法と遅発性神経毒性の発現

1群5羽の成鶏(21月齢)にレプトホス250及び、1,250 mg/kgを1回経口投与した。両群とも5～24時間を極期として急性毒性が100%発現したが、これを耐過したものは3日後に正常に復した。しかし1,250 mg/kg群では投与9日後から100%、250 mg/kg群では20%に特異的症状を呈する運動失調が発現し、遅発性神経毒性(以下、遅発性毒性と略記)を有することが確認された。

次に、250 mg/kgを5～125 mg/kgに分割して各群5羽の成鶏に2～50日間連日経口投与した。83 mg/kg/day以下では急性毒性は全く認められなかったが、それらの群にも遅発性毒性が発現した。これは両毒性は互いに独立したものであることを示唆している。本剤の急性毒性の本態はそのコリンエステラーゼ活性阻害にあるが、250及び1,250 mg/kg 1回投与後の成鶏血漿中の同酵素活性は投与後早期にわずかに低下するものの、速やかに回復し遅発性毒性の発現は本酵素活性の阻害は関与しないものと思われた。前述の分割連日投与での発症状況をみると50 mg/kg 5日間投与が発症率100%、致死率60%と最も著明で、それは250 mg/kg 1回投与より明らかに高い(表1)。また50 mg/kgを投与間隔を変えて間欠的に5回投与すると発症率は連日投与と変りないが、それによる致死率は2日間隔の投与が80%と最高値を示した。これは1回大量投与よりこれを分割して間欠的に与えることが本毒性試験には極めて有効なことをはじめて指摘したもので、本法は他の有機リン剤の遅発性毒性試験にも応用しうるものと思われる。

また急性毒性の発現量よりはるかに少い5又は10mg/kgの連日投与でも遅発性毒性の発現がみられたが、この様に微量のレプトホスが本毒性を示すことは人畜の衛生上極めて重要なことで、従来の毒性試験が急性毒性中心に行なわれていたことの不備を指摘するものである。なお、本毒性の症状は趾端の運動失調に始まり、麻痺を経て死に到るものであるが、著者はこの経過を詳細に観察し、その判定基準を作成した。また発症鶏は麻痺の進行と共に体重が低下し、肝臓及び消化管の萎縮、腹腔脂肪の消耗など飢餓的所見を呈していた。

2. レプトホスに対する感受性に及ぼす加齢の影響

3、6及び21月齢のニワトリに200、400、600、800、及び1,000 mg/kgのレプトホスを1回投与したところ、投与1～2時間目から投与量、月齢に無関係に急性中毒症状が発現したが、その回復は若齢群ほど遅延した。しかし、遅発性神経障害の最少発症量は3及び6月齢群で400 mg/kg、21月齢群で200 mg/kgと高齢群は若齢群より低い傾向に有った。しかし、本毒性についての用量・反応間には200～1,000 mg/kgの範囲では相関が認められず、最少発症量を超えると投与量にかかわらず同様の発症率を示した。そこで用量を無視して発症率を月齢間で比較したところ、3月齢群で43%、6月齢群で44%と同様であったが21月齢群では80%と高齢鶏で特に高いことを知った(表2)。また発症鶏の麻痺への進展率は3月齢30%、6月齢55%、21月齢70%で、また致死は21月齢群でのみ(35%)認められた。本剤の遅発性毒性に対する感受性が加齢によって高まることは従来知られていなかった知見である。

なお、投与から発症までの期間(潜伏期)はいずれの月齢群でも平均11～12日で差はなかった。

3. 生体試料中レプトホスの分析法

FPDガスクロマトグラフで定性試験を行なったところ、パラチオンに対するレプトホスの相対保持時間は5%OV-1カラムで4.85、5%DC-11カラムで4.44であり、比較的その長い有機リン剤に属することがわかった。

血液中レプトホスの分析は有機塩素系農薬の分析に用いられているDaleらの方法にはば準じた。回収率は98.7%であった。

臓器及び組織中レプトホスの分析にあたっては、アセトニトリルあるいは石油エーテルによる液-液分配及びフロリジルカラムを通しての精製が不可欠であった。従来から脂肪性食品中の残留有機塩素系農薬の分析法としてはFDA法等が知られている。しかし有機リン剤は熱やアルカリ性に弱いとされているので、脂肪組織からの脂肪分抽出過程に一部変更を加えた。またフロリジルカラムからのレプトホスの溶出にあたっては、溶出効率の最も良好な溶媒を選択し、これを使用した。これらの知見から図1に示した分析法を以下の実験に用いることとした。なお、本法における脂肪組織に添加し

たレプトホスの回収率は 84.7 %であった。

4. 血液及び脂肪組織中レプトホスの消長

成鶏（24月齢）に50mg/kgレプトホスを1回投与し、その血漿中濃度を調べたところ、投与1時間後に最高値 121 ppb を示した後速やかに低下し、48時間後には検出できなくなった。また 250 mg/kg 投与ではその経過はやや延長し、3時間目に最高値 805 ppb に達した後速やかに低下し、72時間目に検出不能となった（図2）。投与後各時点における血中濃度は3時間目を除き 250 mg/kg群は50mg/kg群のはば2倍で投与量の比よりも一般に低く、血中への吸収速度は大量投与では比較的遅いが、血中からの消失速度は逆に速いことが示唆された。

一方、腹腔の脂肪組織中レプトホス濃度は投与1時間後から終始血中濃度の1.2～960倍と明らかに高値を示し、それが血中から消失した投与72時間後にもその大半が残存した（図3）。これは本剤が *in vivo* でも脂溶性であることをはじめて証明したものである。

次に、成鶏（21月齢）に 250 mg/kg のレプトホスを1回投与し、体脂肪中の濃度変化を逐日調べたところ、それは28日後にも検出され本剤は鶏体内にながく残留することが明らかとなった。またこの間の生物学的半減期は 118.4 時間であり、蓄積性の限界とされる半減期 16.7 時間よりはるかに長く、本剤が脂肪組織中に蓄積することが示唆された。

そこで、成鶏（22月齢）に 5、10及び20mg/kgを連日投与し、脂肪組織中のレプトホス濃度を測定したところ、その濃度は投与日数の増加に従い段階的に上昇し（図4）、本剤の脂肪組織への蓄積が確認された。またその濃度は同一投与日数では1回の投与量にはば比例し、遅発性毒性による発症例の認められた10mg/kg群及び20mg/kg群の発症時点における濃度は前者で平均 3.5 ppm、後者で 6 ppm 程度と推定された。また発症例のなかった 5 mg/kg群では28日間の投与で平均 2 ppmを超えることはなかった。

5. レプトホスの脳・脊髄中濃度

成鶏（23月齢）に 200 - 1,000 mg/kg のレプトホスを1回経口投与し、24時間後の脳、脊髄中の濃度を測定した。脳では 200 mg/kg群は 0.2 ppm、400 - 1,000 mg/kgの各群はその 2.5～3.5 倍、脊髄では 200 mg/kg群は 0.3 ppm、400 - 1,000 mg/kgの各群ではその 2～3 倍で、神経組織中の本剤の濃度は 400 mg/kg以上の投与で頭打ちになる傾向にあった。これは 400 mg/kg以上の1回投与では発症率が投与量と相関しないという前述の知見と一致する。なお、脳、脊髄中濃度を較べると一般に後者が高いが、両者には高い正の相関（ $r = 0.81$ ）があった。

次に、400 mg/kgのレプトホスを同様の成鶏に1回投与し、1日後から15日後までの脳、脊髄中濃度を測定したところ、それは1日目をピークに速やかに低下し、8日目には痕跡をとどめる程度とな

った。また11日目以降に発症した例でも15日目には検出不能であった(表3)。神経組織中のレプトホス濃度は脂肪組織中のそれに較べ明らかに低く、また残留期間も短いことを示すもので、神経組織での残留が発病に関与しないことを示唆している。特に発症鶏の神経組織からレプトホスが検出されなかったことは、それが、神経組織への直接作用とすれば、作用時点は比較的早期にあることを示すものと思われる。

6. レプトホスの諸臓器中濃度に及ぼす加齢の影響

レプトホスを成鶏(21~23月齢)と大雛(3月齢)に400 mg/kg経口1回投与し、組織中のその濃度を調べた。投与24時間後の湿潤組織当りの平均濃度は成鶏では脂肪組織(11.4 ppm)、心臓及び腎臓(>1.0 ppm)、脊髄及び脳(0.5~0.7 ppm)、肝臓、筋肉及び血漿(0.2 ppm)となり、脂肪組織中濃度が他に較らば著明に高かった。また大雛でも脂肪組織(8.7 ppm)が最も高濃度で、次いで心臓(1.8 ppm)が比較的高い値を示したが、他の諸組織中濃度は成鶏同様1 ppm以下であり、月齢間の差はなかった。

一方、組織中レプトホスの総量は成鶏では脂肪組織平均346 µg、腎臓、心臓、肝臓、大腿二頭筋6~14 µgであり、大雛では脂肪組織16 µg、大胸筋その他では6~15 µgであった(表4)。すなわち、成鶏の脂肪組織には大雛の約20倍のレプトホスが取込まれており、著しい月齢間の差が認められた。

次に、成鶏(21月齢)と若鶏(6月齢)にレプトホス250 mg/kgを1回投与し逐日脂肪組織中の濃度を測定した。成鶏の生物学的半減期は前述のごとく118.4時間であり、投与28日後もレプトホスが体脂肪から検出された。一方、若鶏では14日後からその検出されない個体が出現し、28日後には全く検出されなくなり、その生物学的半減期は35.9時間で成鶏のそれよりも1/3も短縮した(図5)。

以上のことから、脂肪組織の発達した成鶏では若齢鶏に較らば脂肪組織に大量に貯蔵されたレプトホスが長期にわたり緩やかに遊離し、それが標的組織を侵すものと思われ、それが加齢による感受性の上昇に関連するもののように考えられる。しかし、400 mg/kg投与後6~72時間の大雛及び成鶏の脳、大腿二頭筋内のレプトホス濃度の消長には加齢の影響は特に認められず、生物学的半減期も共に脳で約16時間、筋肉で30時間前後であった。また72時間後の濃度はいずれも0.1 ppm程度で、この半減期を当てはめるとこれらの組織からは比較的短時間で検出されなくなるものと思われる。この知見を考慮すると本剤の標的組織は中枢神経組織や筋肉組織以外にあるように考えられるが、この点は更に追求する必要がある。

以上、著者はニワトリを用いてレプトホスの遅発性毒性の発現条件を検討し、それは急性毒性とは異なる機序により発現することを明らかにすると共にその発現に有効な分割間欠投与法を発見し、これ

が他の有機リン殺虫剤の毒性試験にも応用し得ることを示唆した。

また本剤が鶏体内の脂肪に残留、蓄積することや微量の連続摂取で毒性が発現することから、この人畜における衛生学的意義を指摘した。

次に、この遅発性毒性に対する感受性が加齢により異なることやその生体内分布から、その毒性発現の機序の一端を推察した。

研 究 資 料

表1 レプトホス 250 mg/kg 分割連続投与成鶏の遅発性神経障害

1 回 の 投 与 量 (mg/kg)	投 与 日 数	供 試 羽 数	運 動 失 調 羽 数 (発症率%)	投 与 開 始 か ら 運 動 失 調 発 現 ま で の 平 均 日 数	麻 痺 羽 数	麻 痺 死 羽 数 (致死率%)
250	1	5	0 (0)	—	0	0 (0)
125	2	5	1 (20)	21	1	0 (0)
83	3	5	4 (80)	14.3	4	2 (40)
50	5	5	5 (100)	13.4	5	3 (60)
25	10	5	3 (60)	19.0	3	1 (20)
10	25	5	4 (80)	26.0	0	0 (0)
7.5	33	5	2 (40)	33.5	1	1 (20)
5	50	5	1 (20)	38	1	1 (20)

表2 レプトホス 200 ~ 1000 mg/kg 投与鶏の遅発性
神経障害発現に及ぼす加齢の影響

	供 試 鶏 の 月 齢		
	3	6	21
供 試 羽 数	23	25	25
最 少 発 症 量	400 mg/kg	400 mg/kg	200 mg/kg
発 症 ま で の 平 均 日 数	11.6 日	12.4 日	11.0 日
発 症 率	43 %	44 %	80 %
麻 痺 出 現 率	30 %	55 %	70 %
致 死 率	0 %	0 %	35 %

表3 レプトホス 400 mg/kg 経口1回投与成鶏の神経組織中濃度と
遅発性神経障害

個 体 番 号	屠殺までの日数	組 織 中 濃 度 (ppm)		神 経 障 害 の 程 度
		脳	脊 髄	
101	1	0.33	0.64	—
102	1	0.38	0.53	—
103	1	0.43	0.65	—
104	1	1.32	0.99	—
105	3	N. D. 1)	0.04	—
106	3	0.05	0.15	—
107	3	0.06	0.06	—
108	3	0.14	0.20	—
109	8	N. D.	N. D.	—
110	8	N. D.	Tr. 2)	—
111	8	N. D.	N. D.	—
112	8	N. D.	N. D.	—
113	15	N. D.	N. D.	—
114	15	N. D.	N. D.	+ 3)
115	15	N. D.	N. D.	+
116	15	N. D.	N. D.	+

1) N. D. 検出されず。 2) Tr. < 0.04 ppm.

3) +軽度の運動失調、+重度の運動失調

表4 大雛及び成鶏におけるレプトホス 400 mg/kg 投与 24 時間後の
諸組織中総量

組 織	組 織 中 の レ プ ト ホ ス 総 量 (μg)	
	大 雛 1)	成 鶏 1)
脳	1.31 ± 0.67(1) 2)	1.61 ± 0.95(1)
脊 髄	—	1.75 ± 0.54(4)
肺	3.64 ± 0.89(2)	3.08 (1)
心 臓	8.63 ± 2.60(2)	12.7 ± 8.94(5)
肝 臓	8.35 ± 5.66(2)	7.38 ± 3.19(5)
腎 臓	6.46 ± 0.13(2)	13.5 ± 3.18(3)
脂 肪 組 織	16.2 ± 12.9 (2)	345.9 ± 140.8 (5)
大 胸 筋	15.1 ± 0.99(2)	35.8 ± 20.3 (3)
大 腿 二 頭 筋	8.08 ± 1.07(2)	5.66 ± 1.71(2)

1) 大雛は3月齢、成鶏は21～23月齢であった。

2) m ± S. D. (n)

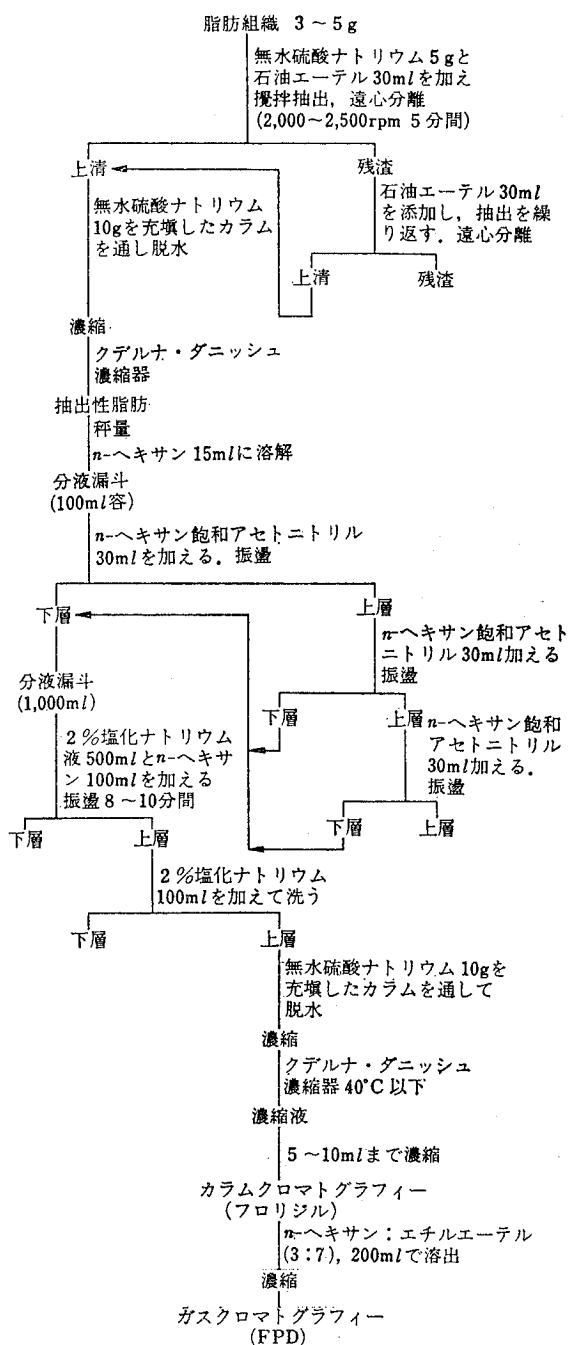


図1 脂肪組織中レプトホスの分析法

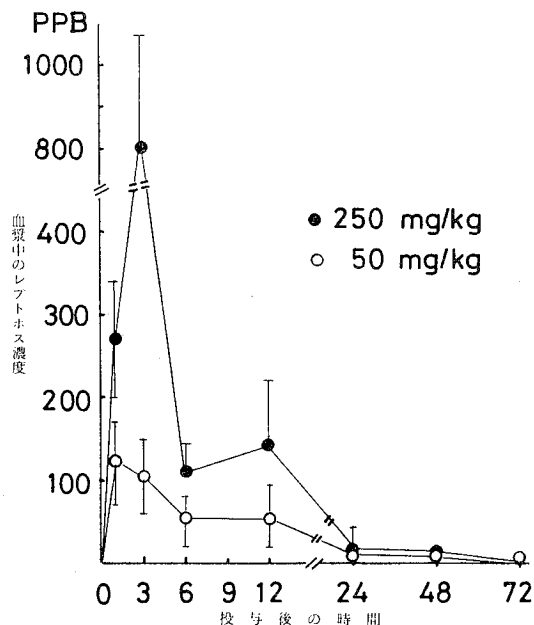


図2 成鶏におけるレプトホス 50 mg/kg および 250 mg/kg 投与後の血漿中濃度の経時的変化

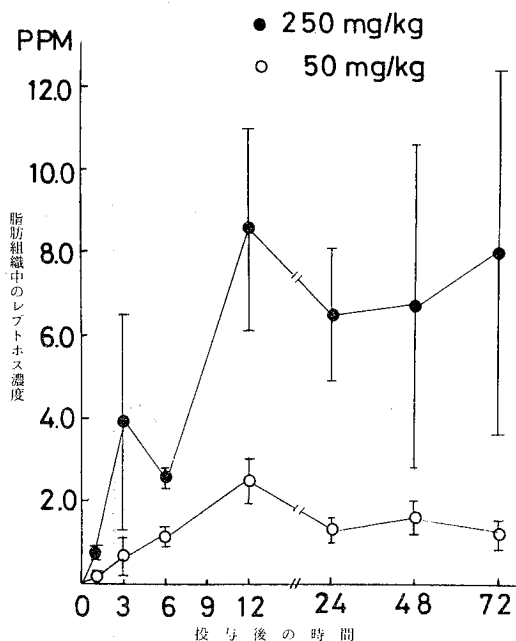


図3 成鶏におけるレプトホス 50 mg/kg および 250 mg/kg 投与後の脂肪組織中濃度の経時的変化

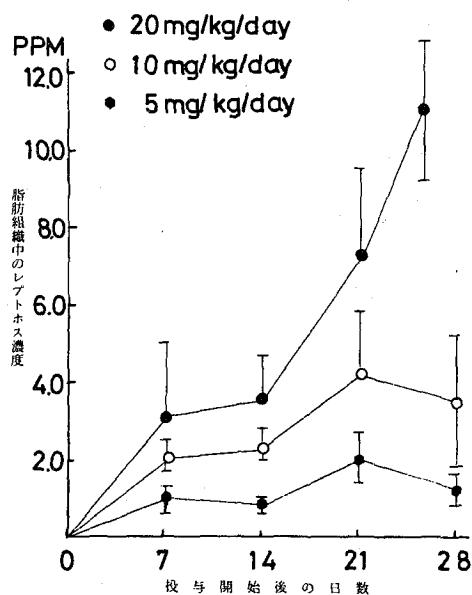


図4 レプトホス連日投与による成鶏脂肪組織への蓄積

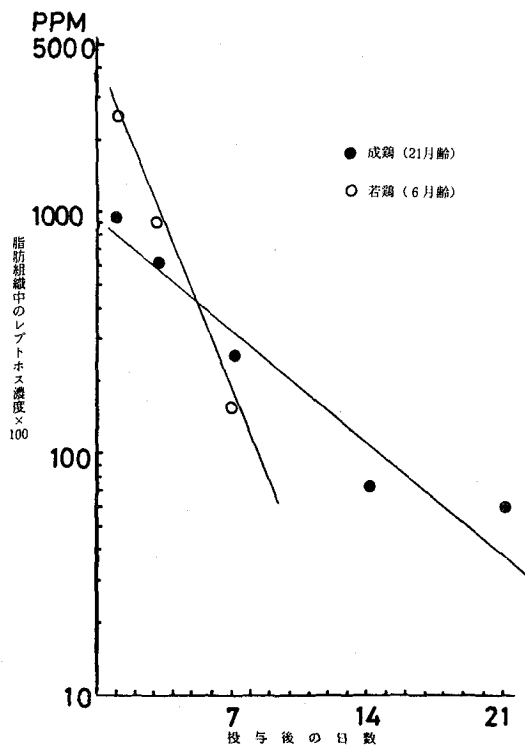


図5 若鶏及び成鶏におけるレプトホス 250 mg/kg 投与後の脂肪組織中濃度の減衰

審 査 結 果 の 要 旨

レプトホスは本邦では1969年から市販された所謂低毒性有機リン殺虫剤であるが、Abou - Donia ら（1974年）はこれが一般有機リン剤のもつ毒性とは異なる遅発性神経毒性を有することを指摘した。これを機に著者はニワトリを用いて、本剤の毒性発現の条件、体内分布を検討し、遅発性神経毒性の試験法の確立、本毒性の発現機序の解明を企図し、以下の知見を得た。

まず、著者はAbou - Donia の知見を追試確認した後、本毒性による発症経過を仔細に観察し、その判定基準を作成した。ついで本剤の投与方法と毒性発現との関係を調べ、最少発症量を示すと共に1回大量投与よりも少量分割投与が本毒性の試験に極めて有効なことを指摘した。これは従来毒性試験法の不備と本剤の微量連続摂取が人畜に影響することを示唆したものである。また、この実験で雛に較らば成鶏は本毒性に対する感受性が著明に高いこと、急性毒性とは異なりコリンエステラーゼ活性阻害はこれに関与しないことを明らかにした。

つぎに著者は生体試料中の本剤の定量法を確立し、ニワトリ体内における本剤の分布を調べ、本剤が体脂肪に速かに高濃度に取り込まれ長期間残留し、また連続投与ではここに次第に蓄積することを示した。また、これは脳、脊髄、筋肉中にも移行するが、その濃度は脂肪中より著しく低く、その生物学的半減期も雛、成鶏共に短く、これらの組織への蓄積性はないものと推定した。また本毒性発現時にはこれら組成から本剤は検出し得なくなることから、これが神経への直接作用によるものとすれば潜在的作用時点は比較的早期にあるものと推察した。しかし、脂肪中の本剤の分布を成鶏と雛で較らべると前者のプールサイズや生物学的半減期の有意に大きいことから、脂肪組織から不断に遊離する微量の本剤が標的組織の障害を拡大し本毒性を発現するものと考察した。

以上のことは低毒性有機リン剤には急性毒性とは異なる遅発性神経毒性を有するものがあることを確認し、その有効な試験方法を提示すると共にその毒性発現の機序解明に有力な手懸りを与えたもので、人畜の衛生に寄与するところ大きく審査員一同は著者は農学博士の学位を得るに値するものと認めた。